Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 367-380

Investigating Growth and Biochemical Responses of Marjoram (*Origanum majorana*) to Cadmium and Lead

M.B. Razavinia[1], N. Pourghasemiani[2*], F. Najafi[3]

1 and 3- Master Graduate and Assistant Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Productions, Agricultural Faculty of Bardsir, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
(*- Corresponding Author Email: n.pourghasemian@uk.ac.ir)

Received:	18-10-2023	**How to cite this article:**
Revised:	24-01-2024	Razavinia, M.B., Pourghasemiani, N., & Najafi, F. (2024). Investigating growth and biochemical responses of marjoram (*Origanum majorana*) to cadmium and lead. *Journal of Horticultural Science*, *38*(2), 367-380. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84918.1296
Accepted:	13-02-2024	
Available Online:	13-02-2024	

Introduction

Heavy metals, like cadmium, lead, and arsenic, harm air, soil, agriculture, and human health. Plants suffer from reduced growth, chlorophyll production, and enzyme activity due to heavy metal exposure. Reactive oxygen species are produced, damaging biological molecules. However, plants have developed resistance mechanisms, including antioxidant stimulation. Flavonoids, complex compounds in plants, enhance resistance to heavy metals. Medicinal plants, rich in secondary metabolites like flavonoids, phenolic compounds, and alkaloids, show resistance to heavy metals. *Origanum majorana* as a medicinal plant, contains compounds that contribute to its heavy metal resistance. Based on limited studies, medicinal plants, particularly marjoram, have shown greater resistance to environmental stresses due to their secondary metabolites and the ability to produce uncontaminated essential oils in response to heavy metals like cadmium and lead. This study aimed to investigate the biochemical responses and growth of marjoram plants when exposed simultaneously to cadmium and lead, as well as the mutual effects of these two elements on marjoram behavior.

Materials and Methods

A factorial randomized complete block design experiment with four replications was used to study the effect of Cd in four concentrations (0, 6, 12 and 24 mg.kg^{-1} soil) as well as Pb in four concentrations (0, 150 300 and 450 mg. Kg^{-1} soil). The concentrations were determined based on previous reports and a preliminary experiment. Soil was prepared with appropriate amounts of cadmium chloride and lead chloride were added according to the desired concentrations. The contaminated soil was then incubated at field capacity moisture for two months. Seeds have been sown in germination trays. Seedlings at the three to four leaf stage were transferred to pots containing the contaminated soil. Plant harvest took place 42 to 52 days after the transfer to pots, specifically when the plants had just entered the flowering stage. The aboveground parts of the plants were harvested separately, and the roots were carefully removed from the soil. Half of the plants were dried at 105 °C for 24 h to determine the dry weight, Pb and Cd concentrations. The other half of the plants were used to measure biochemical traits including flavonoids, anthocyanins, malondialdehyde, protein, proline and some enzymatic antioxidants. The data was analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA), and the means were compared using the LSD test. A significance level of 95% was applied using SAS 9.2.

Results and Discussion

In this study, various parameters were measured including the dry weight of aerial parts and roots,

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84918.1296

concentrations of lead and cadmium in the aerial parts and roots, lipid peroxidation (MDA), flavonoids, anthocyanins, total phenols, proline, protein, and antioxidant enzymes including guaiacol peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX), and catalase (CAT). The results of the analysis of variance showed that all the mentioned traits were influenced by the individual effects of lead and cadmium. However, there was no significant interaction between cadmium and lead on proline, protein, GPX, polyphenols, flavonoids, and anthocyanins. The dry weight of aerial parts and roots decreased in the presence of cadmium and lead, while the concentrations of lead and cadmium increased. However, this damage was more pronounced in the presence of cadmium compared to lead. The presence of cadmium in a lead-containing environment had an inhibitory effect on lead uptake by the plant, and vice versa. The highest level of MDA was reported in the combination of lead and cadmium concentrations of 450 and 24 mg/kg, respectively. The analysis of enzyme activity showed that the maximum catalase activity was observed in the combination of 6 and 450 mg/kg of cadmium and lead, respectively, while the minimum activity was found in the control group. Similarly, the highest APX activity was reported in the combination of 24 mg/kg of cadmium and zero lead, while the lowest activity was observed in the control group. The use of cadmium and lead at the highest consumption level compared to the control group resulted in a 204% and 40% increase in GPX activity, respectively. In the analysis of total phenols, flavonoids, anthocyanins, and protein, an increase in cadmium concentration from zero to 24 mg/kg led to a decrease of 52%, 42%, 208%, and 81%, respectively, while protein decreased by 39%. These traits showed an increase of 14%, 14%, 58%, and 40%, respectively, with an increase in lead concentration from zero to 450 mg/kg, while protein decreased by 24%. Based on the results, it appears that the increase in secondary metabolites with the increase in heavy metals has accompanied the plant's response to the prevailing conditions.

Conclusion

The study found that both cadmium and lead negatively affect the dry weight of plants, with cadmium having a greater impact. This reduction is particularly noticeable in photosynthesis, pigments, electron transport chain, and energy production. The highest concentrations of lead and cadmium (24-450 mg/kg) show the maximum decrease. As the concentrations of these elements increase in the growth medium, their concentration in the plants also increases. Lead has lower mobility and tends to accumulate in the roots compared to cadmium. Interestingly, the presence of cadmium inhibits the uptake of lead by the plant, and vice versa. This leads to an average inhibition of 39% for lead uptake by cadmium and 35% for cadmium uptake by lead in the aerial parts. The study also observed an increase in secondary metabolites, which act as antioxidants and help the plant cope with the stresses caused by cadmium and lead. These metabolites may also contribute to osmotic regulation along with the increase in proline. Based on these findings, it seems that these plants can be used in green spaces contaminated with moderate to low levels of cadmium and lead, particularly in mining areas.

Keywords: Antioxidant, Antocyanin, Flavonoid, Phenol, Proline

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۳، ص. ۳۸۰-۳٦۷

بررسی واکنش‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum majorana*) به فلزات سنگین کادمیم و سرب

محمد باقر رضوی نیا[۱]- نسیبه پورقاسمیان[۲]*- فرزاد نجفی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

چکیده

آلودگی به فلزات سنگین یکی از معضلات اصلی زیست‌محیطی و کشاورزی در دهه‌های اخیر است. مطالعه حاضر به بررسی پاسخ‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه دارویی مرزنجوش بستانی (*Origanom marjoram*) در برابر تنش عناصر سنگین کادمیوم و سرب پرداخته است. این مطالعه در طرح فاکتوریل و در قالب بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار در گلخانه دانشگاه شهید باهنر مرکز آموزش عالی کشاورزی بردسیر در سال ۱۴۰۰ انجام شد. فاکتور اول شامل کادمیوم در چهار سطح (صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و فاکتور دوم شامل سرب در چهار سطح (صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) در نظر گرفته شد. وزن خشک اندام هوایی و ریشه، غلظت سرب و کادمیوم در اندام هوایی و ریشه، پراکسیداسیون لیپیدها (MDA)، فلاونوئید، آنتوسیانین، فنول کل، پرولین، پروتئین، آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی شامل، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) اندازه‌گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کلیه صفات مذکور تحت تأثیر اثرات ساده سرب و کادمیوم قرار گرفتند. اثر متقابل کادمیوم × سرب روی پرولین، پروتئین، GPX، پلی فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین معنی‌دار نبود. وزن خشک اندام هوایی و ریشه در حضور کادمیوم و سرب کاهش و غلظت عناصر سرب و کادمیوم، افزایش پیدا کرده است، بااین‌حال، این آسیب در حضور کادمیوم بیشتر از سرب بود. حضور کادمیوم در محیط حاوی سرب اثر بازدارندگی در جذب سرب توسط گیاه داشت و بالعکس. بیشترین میزان MDA در ترکیب غلظت سرب ۴۵۰ و کادمیوم ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شد. بررسی فعالیت سه آنزیم نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در ترکیب کادمیوم ۶ و سرب ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌میزان ۰/۰۶۶ و کمترین آن در شاهد ۰/۲۷ واحد جذب بر گرم وزن تر بود. همچنین، بیشترین فعالیت APX در ترکیب غلظت ۲۴ کادمیوم و صفر سرب ۳/۲۱ و کمترین آن در شاهد ۰/۹۷ واحد جذب بر گرم وزن تر گیاه گزارش شد. استفاده از کادمیوم و سرب در بالاترین سطح مصرفی نسبت به شاهد، به‌ترتیب سبب افزایش فعالیت GPX به‌میزان ۲۰۴ و ۴۰ درصد گردید. در بررسی فنول کل، فلاونوئید و آنتوسیانین و پروتئین، با افزایش غلظت کادمیوم از صفر به ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به‌ترتیب ۵۲، ۴۲، ۲۰۸ و ۸۱ درصد و برای پروتئین ۳۹ درصد کاهش نشان داد. این صفات با افزایش سرب از صفر به ۴۵۰، به‌ترتیب، ۱۴، ۱۴، ۵۸ و ۴۰ درصد افزایش و برای پروتئین ۲۴ درصد کاهش نشان داد. با توجه به نتایج موجود به نظر می‌رسد که با افزایش عناصر سنگین متابولیت‌های ثانویه افزایش یافته و به دنبال آن مقاومت به فلز سنگین نیز افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان، پرولین، فلاونوئید، فنل

مقدمه

بسیاری از کشورهای جهان به‌دلیل رشد جمعیت و به دنبال آن افزایش رشد صنعت، با مشکلات عدیده آلودگی‌های زیست‌محیطی رو به‌رو هستند. آلودگی‌های شیمیایی از خطرناک‌ترین نوع آلودگی‌هاست، این آلودگی‌ها اثرات بسیار زیادی بر سلامت انسان دارند (Rashid *et al.*, 2023).

عناصر سنگین عناصری هستند که وزن اتمی آن‌ها بین ۵۴۶/۶۳ تا ۵۹۰/۲۰۰ دالتون بوده و جرم مخصوص آن‌ها بزرگ‌تر از پنج گرم بر سانتی‌متر مکعب است. در بین فلزات سنگین برخی از آن‌ها جزء فلزات

۱ و ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاهان دارویی، دانشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: n.pourghasemian@uk.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84918.1296

ضروری محسوب می‌شوند. فلزاتی مانند مس، روی و کبالت در این گروه قرار دارند، درحالی‌که برخی از آن‌ها یا مضر هستند و یا ضرورتشان به اثبات نرسیده است که کادمیوم و سرب و آرسنیک در این گروه قرار گرفته‌اند (Rashid *et al*., 2023).

گیاهان در زمان تجربه تنش آلودگی به فلزات سنگین، درجات مختلفی از مسمومیت ظاهری را نشان می‌دهند. مسمومیت حاصله ناشی از تعداد بی‌شماری از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در داخل گیاه است. از مجموعه اثراتی که عناصر سنگین سرب و کادمیوم می‌توانند بر گیاه داشته باشند، تغییرات در ساختار مورفولوژی و فیزیولوژی گیاه است که شامل کاهش جوانه‌زنی، کاهش طول ریشه و رشد گیاهچه، کاهش تنفس، تولیدات کلروفیل، محتوی آب و پروتئین می‌باشد (Pourrut *et al*., 2011). همچنین عناصر فوق سبب کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های مهم مانند آنزیم‌های چرخه کالوین می‌شود. با توجه به اینکه بسیاری از کوفکتورهای آنزیمی برای فعالیت نیاز به یک فلز دارند که اگر این فلز با فلز دیگر جابه‌جا شود منتج به کاهش شدید فعالیت آن‌ها شده که این اتفاق را در حضور عناصر سنگین در در گیاه می‌توان مشاهده کرد (Nieboer & Richardson, 1980).

همچنین حضور سرب و کادمیوم به‌دلیل اختلال در همئوستازی سلول منجر به افزایش پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سلول گیاهی می‌شود. دیگر گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و ... که قادرند به مولکول‌های بیولوژیک نظیر DNA، پروتئین‌ها، اسید آمینه‌های آزاد، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها آسیب وارد کنند، در هنگام رویارویی با فلزات سنگین از جمله کادمیوم و سرب تولید می‌شوند (Sharma *et al*., 2012).

مکانیسم‌های متفاوتی برای مقاومت و سمیت‌زدایی فلزات سنگین در گیاهان مشاهده شده است. یکی از ایم مکانیسم‌ها، تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌هاست. آنتی‌اکسیدانت‌ها به دو گروه محلول در آب و چربی تقسیم می‌شوند. آنتی‌اکسیدانت‌های محلول در آب شامل ویتامین C، آنتو سیانین‌ها که در گروه فلاونوئیدهای پلی فنول قرار دارند. آنزیم-های آنتی‌اکسیدانتی مانند سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و پراکسیداز و ... و محلول در چربی شامل کارتنوئید، ویتامین E، ویتامین A، و برخی فلاونوئیدها و... می‌باشد (Chen *et al*., 2019)

افزایش فلاونوئید در گیاه آرابیدوپسیس *Arabidopsis thaliana* منجر به افزایش مقاومت نسبت به عناصر سنگین کادمیوم و سرب شد (Keilig *et al*., 2009). فلاونوئید به‌عنوان یک ترکیب پیچیده در گیاه شناخته می‌شود که این فاکتور در زمان حضور عناصر سنگین منجر به بروز حالت دفاعی در گیاه می‌شود (Chen *et al*., 2019).

در پژوهش سئونگ و همکاران (Seung *et al*., 2012) که روی آرابیدوپسیس انجام داده و بررسی میزان رنگیزه‌ها را تحت تیمار سرب در غلظت ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم انجام داده، این‌گونه گزارش کرد که حضور عناصر سنگین سرب و کادمیوم در گیاه منجر به افزایش محتوای آنتوسیانین با یک شیب مشخص شده، ولی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم با شیب بیشتری افزایش یافته است.

متأسفانه بسیاری از گیاهان اثرات مضر عناصر سنگین را می‌پذیرند مثلا تجمع بیش از حد عناصر، منجر به رشد کم و در نهایت، منجر به چرخه پالایش با مدت زمان بیشتری می‌شود (Glick *et al*., 2010). از بین تمامی گونه‌های شناخته شده گیاهان فقط ۰/۲ درصد گیاهان توانایی مقاومت در چنین شرایطی را دارند (Baker *et al*., 1989). در گیاهان دارویی به‌دلیل سازگاری بیوشیمیایی جهت حفاظت و پیشگیری از بیماری‌ها و مقاومت یا سازگاری به شرایط خاص اکولوژیکی، ادافیکی و یا اقلیمی در نیچ خاصی، میزان زیادی متابولیت ثانویه مانند فلاونوئید، مواد فنلیکی، تانن‌ها، ساپونین‌ها، کارتنوئید، آنتوسیانین و بسیاری دیگر تولید می‌شود که منجر به ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های محیطی می‌شود. مثلاً گیاه علف لیمو *Cymbopogon citratus* حاوی فلاونوئید و تانن و آلکالوئیدهای متفاوتی است که اثرگذاری در میزان مقاومت به تنش عناصر سنگین دارد (Ghada, 2017).

مرزنجوش بستانی *Origanum majorana* گیاهی دارویی، یک ساله و در برخی شرایط دو ساله است. مهم‌ترین اجزای اسانس گیاهی آن کارواکرول و یا تیمول است. همچنین ترکیبات شیمیایی دیگر از جمله گاما ترپینن، پاراسیمن، متیل اترهای تیمول و کارواکرول، استات های تیمول و کارواکرول، و نیز ترکیبات دیگری از جمله سزکوئی ترپن-هایی مثل بتاکاریوفیلن، بتابیسابولن، بتابوربونن، ژرماکرن- دی، بی سیکلو ژرماکرن، آلفا هومولن، آلفا مورولن، گاما مورولن، گاما کادینن، آللوآرمادندرون، آلفا کوبن، الفا کوپائن، آلفا کادینول، بتاکاریوفیلن اکساید و ژرماکرن- دی- ۴- اول نیز در اسانس این گیاه وجود دارند (Azizi *et al*., 2015).

بنابراین، با توجه به اینکه از یک طرف مطالعات در زمینه اثر فلزات سنگین سرب و کادمیوم بر گیاه دارویی مرزنجوش محدود است و از طرف دیگر، بسیاری از گیاهان دارویی به‌واسطه متابولیت‌های ثانویه خود می‌توانند در شرایط آلودگی به فلزات سنگین رشد کنند، مطالعه حاضر با هدف بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی و میزان رشد گیاه مرزنجوش در رویارویی هم‌زمان با دو فلز کادمیوم و سرب و بررسی اثر متقابل دو عنصر فوق در چگونگی واکنش مرزنجوش صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار به گونه‌ای که عامل بلوک‌بندی شدت نور بوده،

در گلخانه تحقیقاتی مرکز آموزش عالی کشاورزی بردسیر انجام شد. شرایط دما قابل کنترل بود و همه تیمارها از دمای کسانی برخوردار بودند. فاکتورها شامل کادمیم در چهار سطح صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ (میلی گرم بر کیلوگرم خاک) و سرب در چهار سطح صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ (میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)، در نظر گرفته شدند. لازم به ذکر است که تعیین غلظت‌ها با توجه به گزارش‌ها و انجام یک پیش آزمایش صورت گرفته است.

ابتدا خاک را با خاک برگ و کود به نسبت ۱/۴ مخلوط کرده و سپس میزان کلرید کادمیوم و کلرید سرب لازم با توجه به غلظت‌های تعیین شده، به خاک اضافه شد. لازم به ذکر است که خاک آلوده با حفظ رطوبت در حد ظرفیت زراعی (FC) به‌مدت دو ماه انکوبه گردید.

بذرها (تهیه شده از شرکت سیکاس) در محلول یک درصد هایپوکلریت سدیم به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند و در سینی نشاء کشت گردیدند. گیاهچه‌ها در مرحله سه تا چهار برگی به گلدان‌های حاوی خاک آلوده انتقال داده شدند. آبیاری گلدان‌ها تا نقطه FC صورت گرفته و همچنین به‌منظور جلوگیری از شسته شدن فلزات سنگین و کاهش غلظت آن‌ها در محیط رشد ریشه در زیر هر گلدان یک زیرگلدانی قرار داده تا از خروج زه‌آب جلوگیری شود.

برداشت گیاهان بعد از گذشت ۴۲ تا ۵۲ روز از تاریخ انتقال به گلدان صورت گرفته، به گونه‌ای که گیاه، تازه وارد مرحله گل‌دهی شده باشد. اندام هوایی گیاه جداگانه بریده شده و سپس ریشه‌ها با دقت از خاک بیرون آورده شد. نمونه‌هایی که برای تعیین صفات مرتبط با وزن خشک مورد نیاز بودند، در آون با دمای ۱۰۸ درجه سلسیوس و به‌مدت ۴۸ ساعت خشک شدند.

اندازه‌گیری میزان عناصر در اندام هوایی و ریشه با استفاده از دستگاه جذب اتمی شعله‌دار (SpectraA 55B, varian) صورت گرفت. لازم به ذکر است که نمونه‌های گیاهی، با استفاده از بلوک‌های حرارتی به کمک اسید نیتریک هضم تر گردید (Bermejo., 1999).

غلظت مالون‌دی‌آلدهید نیز به‌روش هیت و پاکر (Heath and Packer, 1968) اندازه‌گیری شد. طبق این روش عصاره گیاهی با ۰/۲ گرم از بافت تازه برگی در هاون چینی حاوی پنج میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد حاصل شد. عصاره به‌دست آمده در محلول واکنش ریخته شد و برای حذف اثر ترکیبات اضافی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر از جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون دی آلدهید از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر استفاده گردید و نتایج حاصل از اندازه‌گیری برحسب وزن تر طبق معادله ۱ محاسبه و ارائه شد.

$$MDA :[(A532-A600)]\times DF\times X\times 1000\times F.W\times \varepsilon \quad (۱)$$

در این معادله، A: مقدار جذب در یک طول موج مشخص، DF: Dilution Factor یا فاکتور رقت (در اینجا=۵)، X: درصدی از TCA که برای استخراج استفاده می‌شود، ε: ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ mM-1cm- و F.W: وزن نمونه تر گیاه می‌باشند.

اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول به‌روش بردفورد (Bradford, 1974) اندازه‌گیری شدند. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکترفتومتر (Spekol 2000) قرائت شد. میزان پروتئین با قرار دادن نتایج در معادله ۲ به‌دست آمد.

$$0062/0067X-0/Y=0 \quad (۲)$$

در این معادله، Y: جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر و X: غلظت پروتئین برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر می‌باشد.

محتوای پلی فنل کل براساس روش گائو و همکاران (Gao *et al.*, 2000) با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد. نمونه‌های تهیه شده در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Spekol 2000- Germany) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فلاونوئیدها به‌روش اسپکتروفتومتری با استفاده از روش وانگر (Wanger, 1979) انجام گرفت. شدت جذب در طول موج‌های ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Spekol 2000) خوانده شد. نتایج برحسب درصد جذب گزارش گردید.

جهت اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌های اندام هوایی از روش وانگر (Wanger, 1979) استفاده شد. جذب عصاره گیاهی در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Spekol 2000) اندازه‌گیری شد. محاسبه غلظت در معادله ۳ با استفاده از ضریب خاموشی $33000\ M^{-1}Cm^{-1}$ انجام و نتایج برحسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردید.

$$A= \varepsilon bc \quad (۳)$$

در این معادله، A: جذب در ۵۵۰ نانومتر، B: ۱، C: میزان فعالیت آنزیم/ ε: ضریب خاموشی، در واحد میکروگرم بر گرم وزن تر می‌باشد.

جهت اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی شامل APX ،CAT و GRX عصاره آنزیمی با روش لاوری و همکاران (Lowery *et al.*, 1951). تهیه شد و سپس برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز از روش ابی و همکاران (Aebi *et al.*, 1984) استفاده شد. ضریب خاموشی برای کاتالاز ۳۹/۴ میلی‌مول بر سانتی‌متر گزارش شده است. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز براساس روش (Pandey *et al.*, 1984) در یک میلی‌لیتر بافر واکنش اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی برای آنزیم آسکوربات برابر ۲/۸ میلی‌مولار بر سانتی‌متر است.

فعالیت گایاکول پراکسیداز پس از تهیه مخلوط واکنش افزایش جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر ثبت گردید. ضریب خاموشی مولی این

آنزیم، برابر ۲۶/۶ میلی‌مول بر سانتی‌متر در معادله ۴ جاگذاری شده و فعالیت آنزیمی برحسب واحد در گرم وزن تر بیان شد.

$$A= \varepsilon bc \quad (۴)$$

در این معادله، A: جذب، B: ۱، C: میزان فعالیت آنزیم، ε: ضریب خاموشی، واحد فعالیت آنزیم برحسب $unit / g\ Fw^{-1}$ می‌باشد.

تجزیه واریانس داده‌ها با برنامه SAS (۹،۱) صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام شد.

نتایج و بحث

وزن خشک ریشه و اندام هوایی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه مرزنجوش تحت تأثیر اثر ساده و متقابل کادمیوم و سرب قرار گرفت ($P>0.01$).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سرب و کادمیوم نشان داد که وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه، به تبعیت از افزایش میزان غلظت عناصر سنگین، کاهش یافته است، به گونه‌ای که با افزایش غلظت دو فلز در محیط کشت مرزنجوش، کاهش ۹۱ درصدی در وزن خشک ریشه از شاهد تا حضور حداکثری عناصر (۴۵۰ سرب و ۲۴ کادمیوم) مشاهده شده است (جدول ۲). همچنین ، کاهش ۸۷ درصد ناشی از حضور حداکثری عناصر نسبت به شاهد در اندام هوایی گزارش شده است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس وزن خشک ریشه و اندام هوایی، غلظت سرب و کادمیوم در اندام هوایی و ریشه و غلظت مالون دی آلدهید در گیاه مرزنجوش تحت تیمار سرب و کادمیوم

Table 1- The ANOVA results for the root and shoot dry weight, lead and cadmium concentration in shoot and root and malondialdehyde concentration in *Origanum majorana* under lead and cadmium treatment

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	غلظت سرب اندام هوایی Pb shoot concentration	غلظت سرب ریشه Pb root concentration	غلظت کادمیوم اندام هوایی Cd shoot concentration	غلظت کادمیوم ریشه Cd root concentration	غلظت مالون دی آلدهید MDA
تکرار R	2	ns0.051	ns0.039	ns262.11	ns2.98	ns1.93	ns0.17	ns28.47
Cd کادمیوم	3	28.47**	84.32**	13655.62**	405.76**	**5475.31	**923.21	**2566.46
Pb سرب	3	6.08**	20.33**	351671.51**	7076.39**	**215.69	**61.27	**543.16
Cd × Pb	9	0.039**	1.07**	2123.14**	113.54**	**30.28	**11.54	*19.66
Total error خطای کل	60	0.013	0.19	300.03	14.12	3.63	1.04	6.44

*و**به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns غیر معنی‌دار

*and** : significant at the 5 and 1% of probability levels, respectively,and ns: non-significant.

با افزایش کادمیوم، از غلظت صفر در محیط، تا غلظت ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، وزن خشک ریشه و اندام هوایی، به‌ترتیب ۸۰ درصد و ۷۳ درصد کاهش پیدا کرد. همچنین با افزایش سرب از غلظت صفر تا غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، وزن خشک ریشه و اندام هوایی به‌ترتیب ۴۷ درصد و ۴۳ درصد کاهش پیدا کرد (جدول ۲). به نظر می‌رسد که کاهش بیشتر وزن خشک ریشه و اندام هوایی توسط کادمیوم، به‌دلیل تحرک بالاتر و سمیت بیشتر این عنصر شیمیایی بوده است (Rashid *et al.*, 2023).

از دیدگاه فیزیولوژیکی می‌توان این‌گونه بیان نمود که به‌دلیل تحرک بیشتر کادمیوم نسبت به سرب؛ همراه آب و شیره گیاهی، کادمیوم بیشتر از سرب به اندام‌های گیاهی فرستاده می‌شود، در نتیجه مسمومیت بیشتری نسبت به سرب در اندام هوایی ایجاد می‌کند (Abdel-Salam *et al.*, 2015).

جدول ۲- اثر متقابل سرب × کادمیوم بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی، غلظت کادمیوم و سرب در ریشه و اندام هوایی و غلظت مالون دی‌آلدهید گیاه مرزنجوش

Table 2- The interaction effect of Cd×Pb on the dry weight of root and shoot (g.pot^{-1}), concentration of cadmium and lead in root and shoot and concentration of malondialdehyde)

منابع تغییرات S.O.V	وزن خشک ریشه Root dry weight (g.pot^{-1})	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (g.pot^{-1})	غلظت کادمیوم اندام هوایی Cd shoot concentration (µg.g^{-1} DW)	غلظت کادمیوم ریشه Cd root concentration (µg.g^{-1} DW)	غلظت سرب اندام هوایی Pb shoot concentration (µg.g^{-1} DW)	غلظت سرب ریشه Pb root concentration (µg.g^{-1} DW)	غلظت مالون دی آلدهید MDA (µMol.g^{-1}FW)
Cd0 × pb0	4.99 ^{a}	9.32 ^{a}	1.20 ^{j}	2.20 ^{l}	3.10 ^{i}	4.30 ^{g}	26.30 ^{i}
Cd0 × pb150	4.58 ^{b}	9.11 ^{ab}	1.50 ^{j}	2.20 ^{l}	19.20 ^{gf}	1.1 ^{e}	26.84 ^{i}
Cd0 × pb300	4.28 ^{c}	8.01 ^{c}	1.50 ^{j}	1.98 ^{l}	37.20 ^{d}	256 ^{bc}	30.78 ^{gh}
Cd0 × pb450	3.46 ^{d}	6.08 ^{de}	1.29 ^{j}	1.94 ^{l}	68.20 ^{a}	312 ^{a}	38.79 ^{f}
Cd6 × pb0	4.54 ^{b}	8.66 ^{abc}	9.35 ^{g}	22.36 ^{i}	3 ^{i}	4.30 ^{g}	27.51 ^{hi}
Cd6 × pb150	4.49 ^{b}	8.49 ^{bc}	8.01 ^{gh}	19.32 ^{ij}	17.36 ^{fgh}	97 ^{ef}	28.32 ^{hi}
Cd6 × pb300	3.25 ^{e}	6.70 ^{d}	7.15 ^{hi}	16.33 ^{j}	33.98 ^{de}	249 ^{c}	32.30 ^{g}
Cd6 × pb450	2.04 ^{h}	4.44 ^{g}	5.66 ^{i}	14.02 ^{kj}	60.28 ^{b}	299 ^{a}	47.50 ^{de}
Cd12 × pb0	2.75 ^{f}	5.51 ^{ef}	19.54 ^{c}	38.91 ^{e}	3 ^{i}	4.10 ^{g}	39.80 ^{f}
Cd12 × pb150	2.50 ^{g}	4.99 ^{fg}	17.33 ^{d}	35.11 ^{f}	15.20 ^{gh}	86 ^{ef}	44.50 ^{e}
Cd12 × pb300	2.16 ^{h}	4.40 ^{g}	14.22 ^{e}	31.11 ^{g}	29.77 ^{e}	221 ^{d}	47.10 ^{de}
Cd12 × pb450	1.32 ^{i}	3.55 ^{h}	12.05 ^{f}	25.50 ^{h}	49.30 ^{c}	274 ^{b}	50.30 ^{cd}
Cd24 × pb0	1.44 ^{i}	3.57 ^{h}	27.01 ^{a}	61.32 ^{a}	2.6 ^{i}	3.70 ^{g}	51.80 ^{bc}
Cd24 × pb150	0.95 ^{j}	2.39 ^{i}	21.54 ^{b}	54.17 ^{b}	12.35 ^{h}	78 ^{f}	55.40 ^{b}
Cd24 × pb300	0.58 ^{k}	1.61 ^{j}	19.41 ^{c}	50.19 ^{c}	21.47 ^{f}	201 ^{d}	59.71 ^{a}
Cd24 × pb450	0.42 ^{k}	1.21 ^{j}	16.88 ^{d}	43.28 ^{d}	38.11 ^{d}	252 ^{c}	61.20 ^{a}

در هر ستون و برای هر صفت، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

In each column and for each attribute, the means that have at least one letter in common are not significantly different based on LSD test at the 5% of probability level.

تأثیر فلزات سنگین بر کاهش وزن خشک گیاه، عبارتند از کاهش جذب مواد معدنی و آب توسط ریشه، ایجاد حالت نکروزه و کلروزه در برگ کرده که در نهایت، به کاهش رشد ریشه منجر می‌شود که این امر خود سبب کاهش فتوسنتز از طریق چرخه الکترون شده و منتج به کاهش وزن تر و خشک گیاه می‌گردد (Abdel-Salam *et al.*, 2015).

غلظت کادمیوم و سرب در اندام هوایی و ریشه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت کادمیوم و سرب در اندام هوایی و ریشه گیاه مرزنجوش تحت اثر ساده کادمیوم و اثر ساده سرب و اثر متقابل کادمیوم و سرب در سطح یک درصد قرار گرفت (جدول ۱).

با افزایش غلظت عناصر در خاک، غلظت فلز در گیاه نیز بالا می‌رود، همچنین افزایش غلظت عناصر در گیاه بستگی به شرایط خاک، نوع گیاه و اسیدیته خاک دارد (Gonzaga *et al.*, 2006). البته می‌توان به این موارد، مواردی دیگر مثل وجود رابطه سینرژیستی یا آنتاگونیستی بین عناصر را نیز اضافه کرد (Dotaniya *et al.*, 2017).

اثر متقابل دو عنصر نشان داد که حداکثر غلظت کادمیوم ریشه و بخش هوایی، در زمان عدم حضور سرب در محیط و حضور حداکثری کادمیوم (۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بوده و کمترین آن در غلظت شش میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم و ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب مشاهده شد که حکایت از اثر بازدارندگی سرب از جذب کادمیوم در مرزنجوش داشت (جدول ۲). به نظر می‌رسد که اثر بازدارندگی سرب از جذب کادمیوم در گیاه، در سطوح پایین و بالای سرب به یک میزان است. همچنین اثر بازدارندگی سرب در جذب کادمیوم در سطوح بالاتر کادمیوم (۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیش از سطح پایین آن (شش میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود (جدول ۲).

بازدارندگی آرسنیک از جذب کادمیوم در گیاه برنج (*Oryza sativa*) نشان داده شده است به گونه‌ای که در حضور کادمیوم و آرسنیک با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک ، غلظت کادمیوم در ریشه گیاه ۳۰۳ میکروگرم بر گرم ماده خشک گیاه بوده و در زمان حضور کادمیوم ۵۰ و آرسنیک ۲۵۰، غلظت کادمیوم در ریشه گیاه ۸۸ میکروگرم بر گرم ماده خشک گیاه بوده که نشان از بازدارندگی جذب در بین عناصر دارد (Zhao & Wang, 2020). در مطالعه دیگری، (Liu *et al.*, 2011) رابطه آنتاگونیستی بین کادمیوم و سرب در برخی گیاهان زینتی به اثبات رسید، بااین‌حال میزان این اثر در گیاهان مختلف متفاوت است. شاید بتوان این تفاوت را به ترشحات ریشه‌ها در گیاهان مختلف، نسبت داد. این تفاوت باعث به‌وجود آمدن یکسری تغییرات

شیمیایی و فیزیکی در خاک شده که در تجمع و جذب کادمیوم و سرب مؤثر است (Peter *et al.*, 2011).

همچنین حداکثر غلظت سرب در ریشه و بخش هوایی مرزنجوش در زمان عدم حضور کادمیوم در محیط و حضور حداکثری سرب (۴۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بوده و کمترین آن در غلظت ۲۴ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سرب مشاهده شد. به نظر می‌رسد اثر بازدارندگی کادمیوم در جذب سرب در اندام هوایی و ریشه در سطح بالاتر کادمیوم بیشتر است. در سطح بالای سرب (۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم)، کادمیوم از همان غلظت شش میلی‌گرم بر کیلوگرم گیاه را به‌سمت جذب کمتر سرب هدایت کرده است. درحالی‌که در سطح پایین سرب (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، بین غلظت‌های ۶ و ۱۲ و ۲۴ کادمیوم، تفاوت معنی‌داری به لحاظ غلظت سرب در بخش هوایی و ریشه گیاه، وجود نداشت (جدول ۲). همچنین نتایج مطالعه جدید نشان داد که تجمع کادمیوم و سرب در ریشه نسبت به اندام هوایی بیشتر بود (جدول ۲).

برخی از بررسی‌ها نشان داده که توزیع کادمیوم در اندام‌های گیاهی در گیاهان با یکدیگر متفاوت است. به‌عنوان مثال، نتایج پژوهشی نشان داد که غلظت کادمیوم در گیاه گوجه‌فرنگی *Solanum lycopersicum* ، فلفل سبز *Capsicum annuum* و نعناع فلفلی *Mentha piperita* در ریشه بیشتر از اندام هوایی بود، درحالی‌که تجمع کادمیوم در اندام هوایی کلم چینی بیشتر از ریشه گزارش شد (Liu *et al.*, 2011). بنابراین، وجود مکانیسم‌های متفاوت فیزیولوژیکی در گیاهان، از جمله وجود فیتوکلاتین‌ها و یا سوبرین لاملا در ریشه برخی گیاهان می‌تواند در توجیه این تفاوت‌ها مؤثر باشد (pourghasemian *et al.*, 2019).

مالون دی آلدهید

میزان مالون دی آلدهید به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها، تحت تأثیر اثر ساده کادمیوم و سرب (۱ درصد) و اثر متقابل کادمیوم و سرب (۵ درصد) قرار گرفت (جدول ۱).

میزان مالون دی آلدهید مشخص‌کننده آسیب به غشاهای سلولی است که با افزایش آلدهیدها و کتون‌های سمی در گیاه همراه است (Morales & Munné-Bosch, 2019). گرچه فرایندهای تولید ROS در شرایط نرمال آهسته است، امّا سرب و کادمیوم سبب افزایش تولید آن‌ها می‌شود. لذا گونه‌های فعال اکسیژن سبب القای تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در گیاه می‌شوند (Kaur *et al.*, 2012).

در بررسی اثرات متقابل عناصر بر فاکتور MDA، افزایش میزان مالون دی آلدهید در ترکیب حداکثر غلظت عناصر با مقدار ۷۶ میکرومول بر گرم وزن تر مشاهده شد. کمترین میزان MDA نیز مربوط به شاهد با مقدار ۲۷/۰۱ میکرومول بر گرم وزن تر بوده است (جدول ۴).

بررسی اثر متقابل سیلیسیوم و کادمیوم بر گیاه چغندر *Beta vulgaris* نشان داد، درصورتی‌که در محیطی دو عنصر با هم قرار گیرند، اثر بازدارنده در بحث جذب بر روی هم داشته‌اند. همچنین سیلیسیم می‌تواند اثرهای منفی کادمیوم بر روی صفات بیوشیمیایی گیاه چغندر، مثل مالون دی آلدهید، پرولین و فعالیت آنزیمی و صفات فیزیولوژیکی مثل شاخص فتوسنتز و رنگیزه کلروفیل گیاه را کمرنگ کند (Behtash *et al.*, 2011). این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه حاضر به‌طور کامل هماهنگ نبود. به گونه‌ای که در بررسی اثر متقابل کادمیوم و سرب بر گیاه مرزنجوش اثر بازدارندگی در جذب بین دو عنصر مشاهده شد، ولی این بازدارندگی نتیجه مثبتی روی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نداشت. در محیط‌هایی که بیشترین غلظت از هر دو فلز وجود داشت بیشترین میزان MDA نیز مشاهده شد که مسئله حکایت از آسیب‌پذیری گیاه از حضور حداکثری دو عنصر در محیط کشت داشت.

میزان پرولین و پروتئین

میزان پرولین و پروتئین، تحت تأثیر اثرات ساده کادمیوم و سرب (۱ درصد) قرار گرفتند، درحالی‌که اثرات متقابل کادمیوم و سرب بر صفات مذکور تأثیری نداشت (جدول ۱).

در تنش کادمیوم و سرب، میزان پرولین، با افزایش غلظت کادمیوم در محیط، از شاهد تا ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، ۸۱ درصد و با افزایش غلظت سرب در محیط از شاهد تا ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، ۴۰ درصد افزایش یافت (جدول ۴). کادمیوم و سرب بر میزان پروتئین تأثیر عکس گذاشتند و به‌ترتیب باعث کاهش ۳۹ و ۲۴ درصدی در میزان پروتین شدند (جدول ۴). بنابراین، به‌نظر می‌رسد سطوح بالای کادمیوم، بیش از سطوح بالای سرب، برای گیاه مخرب بوده است.

با افزایش غلظت عناصر، میزان پرولین گیاه مرزنجوش افزایش یافته این افزایش می‌تواند در ایجاد مقاومت از طریق تنظیم اسمزی مؤثر واقع شود (Siddique *et al.*, 2018). محققین نتیجه گرفته‌اند که افزایش تجمع پرولین در تنش سرب و کادمیوم ممکن است به‌دلیل افزایش سنتز و یا کاهش تجزیه پرولین و یا هر دو باشد (Naderi *et al.*, 2013). پرولین در بهبود تنش‌های محیطی، از جمله تنش فلزات سنگین در گیاهان و ریزجانداران نقش مهمی ایفا می‌کند. در سلول‌های تحت تنش، نقش آنتی‌اکسیدانتی دارد و به‌عنوان جاروب‌کننده گونه‌های اکسیژن واکنشگر و یک محافظ مولکولی شناخته می‌شود (Siddique *et al.*, 2018).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس محتوی پرولین، پروتئین، فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین و آنزیم‌های CAT، APX و GPX در گیاه مرزنجوش تحت تیمار سرب و کادمیوم

Table 3-The ANOVA results for the proline, protein, phenol, flavonoid, anthocyanin and CAT, APX and GPX enzymes contents in marjoram plant under lead and cadmium treatment

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	پرولین proline	پروتئین Protein	فنل Phenol	فلاونوئید Flavonoid	آنتوسیانین Anthocyanin	آنزیم کاتالاز CAT	آنزیم آسکوربات پراکسیداز APX	آنزیم گایاکول پراکسیداز GPX
تکرار R	2	ns1.58	ns0.066	0.054 ns	0.010 ns	0.05 ns	0.04 ns	0.0204 ns	ns0.0004
کادمیوم Cd	3	765.0**	106.79**	103.67**	1.5**	0.209**	0.00013**	5.8**	0.141**
سرب Pb	3	252.9**	32.23**	12.43**	0.199**	0.038**	0.00078**	0.14**	0.012**
Cd × Pb	9	4.98 ns	1.79 ns	3.04 ns	0.0008 ns	0.001 ns	0.00036**	0.6**	0.0007 ns
Total error خطای کل	60	3.70	1.32	1.61	0.004	0.000001	0.00001	0.01	0.0004

*و**به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و nsغیر معنی‌دار

*and** : significant at the 5 and 1% of probability levels, respectively,and ns: non-significant

دلیل کاهش پروتئین در گیاه می‌تواند مربوط به تغییر در بیان ژن مربوطه، افزایش فعالیت ریبونوکلئاز و پروتئاز و تخریب متابولیسم نیتروژن و در نتیجه، کاهش محتوی آمینو اسید آزاد در گیاه باشد (Chen *et al.*, 2019). حضور سرب و کادمیوم به‌دلیل اختلال در هموستازی سلول منجر به افزایش H_2O_2 در سلول گیاهی می‌شود هیدروژن پراکسید تولید شده می‌تواند منجر به تخریب غشا و پروتئین در گیاه شده، همچنین کادمیوم می‌تواند از طریق ترکیب با گروه تیول پروتئین‌ها منجر به کاهش فعالیت و یا تخریب ساختار پروتئین شود (Mishra *et al.*, 2006).

از طرفی، برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که تنش عناصر سنگین می‌تواند منجر به افزایش پروتئین در گیاه شود (Mishra *et al.*, 2006). پیش از این در مطالعات تاما‌لی و همکاران (Taamalli *et al.*, 2015) مشخص شده است که عناصر سنگین خصوصا کادمیوم، باعث جلوگیری از سنتز ATP در میتوکندری و چرخه کربس، قبل از سیترات، شده که به عنوانی عامل سوخت گلوتامات را افزایش داده تا آنابولیسم گلوتاتیون را به همراه داشته باشد.

فنل و فلاونوئید

کادمیوم و سرب اثر معنی‌داری (۱ درصد) بر محتوای فنل و فلاونوئید گیاه مرزنجوش داشتند، درحالی‌که، اثر متقابل این دو عنصر تأثیر معنی‌داری بر صفات مذکور نداشتند (جدول ۱).

فنل‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و آنتی‌اکسیدانت می‌توانند با اهدای الکترون به گایاکول، آن را تبدیل به آنزیم گایاکول پراکسیداز کنند تا بتواند در فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و پاکسازی گیاه از رادیکال‌های آزاد شرکت کند (Sakihama *et al.*, 2002).

طبق نظر هرناندز و همکاران (Hernandez *et al.*, 2009)، هر ترکیبی که برای اکسید شدن، ساده و آسان باشد می‌تواند یک آنتی‌اکسیدانت خوب در نظر گرفته شود. فلاونوئیدها این توانایی را دارند که با گرفتن الکترون از یون‌های رادیکال آزاد، با استفاده از هیدروژن فنولی خود، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت عمل کرده و گیاه را از اثرات نامطلوب تنش‌های غیرزنده، مثل عناصر سنگین حفظ کند. همچنین نقش فنل و فلاونوئید در کلاته کردن عناصر فلزی به اثبات رسیده است. فنل‌ها از میزان یون آزاد در محیط کاهش داده و آن‌ها را در واکوئل ذخیره می‌کنند.

بااین‌حال میزان فعالیت فنول و میزان محفوظ ماندن گیاه از آسیب فلز سنگین، بستگی به شرایط محیطی، شرایط گیاه، نوع فلز سنگین و شدت تنش دارد (Márquez *et al.*, 2009). به‌طوری‌که در مطالعه حاضر افزایش کادمیوم از صفر به ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک محتوی فنل گیاه را ۵۲ درصد افزایش داده است. این افزایش در حضور سرب در محیط به‌میزان ۱۴ درصد از شاهد تا ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب گزارش شده است. با این وجود، تغییر معنی‌داری بین غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب با شاهد وجود نداشت (جدول ۲).

با افزودن غلظت‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم کادمیوم به محیط کشت، محتوای فلاونوئید گیاه مرزنجوش، به‌میزان ۶ درصد و ۲۴ درصد و ۴۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین با افزودن ۴۵۰، ۳۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم سرب به محیط کشت، محتوای فلاونوئید، به‌میزان ۳ درصد و ۷ درصد و ۱۴ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (جدول ۲). بنابراین، کادمیوم بیش از سرب در تحریک تولید فنل‌ها و فلاونوئیدها نقش داشته است.

جدول ٤- اثر کاربرد کادمیوم و سرب بر محتوی پرولین، پروتئین، فنل و فلاونوئید، آنتوسیانین و آنزیم گایاکول پراکسیداز گیاه مرزنجوش

Table 4- The effect of Cd and Pb on the proline, protein , phenol and flavonoid, anthocyanin and Guaiacol peroxidase enzyme contents in marjoram plant

تیمارها Treatment	پرولین Proline (μM.g^{-1} FW)	پروتئین Protein (mg.g^{-1} FW)	فنل Phenol (mg.g^{-1} FW)	فلاونوئید Flavonoid (mg.g^{-1} FW)	آنتوسیانین Anthocyanin (mg.g^{-1} FW)	آنزیم گایاکول پراکسیداز GPX (unit.g^{-1} FW)
کادمیوم Cd (mg.kg^{-1})						
0	17.44 ^{a}	22.03 ^{d}	13.44 ^{c}	1.87 ^{d}	0.145 ^{d}	0.124 ^{d}
6	14.56 ^{b}	25.69 ^{c}	15.84 ^{b}	2.00 ^{c}	0.265 ^{c}	0.192 ^{c}
12	12.29 ^{c}	33.09 ^{b}	16.53 ^{b}	2.32 ^{b}	0.375 ^{b}	0.269 ^{b}
24	10.54 ^{d}	39.99 ^{a}	20.52 ^{a}	2.66 ^{a}	0.447 ^{a}	0.377 ^{a}
سرب Pb (mg.kg^{-1})						
0	15.28 ^{a}	25.83 ^{d}	15.64 ^{b}	2.08 ^{d}	0.24 ^{d}	0.20 ^{d}
150	14.68 ^{b}	27.82 ^{c}	16.04 ^{b}	2.15 ^{c}	0.28 ^{c}	0.22 ^{c}
300	13.27 ^{c}	30.76 ^{b}	16.68 ^{b}	2.24 ^{b}	0.31 ^{b}	0.24 ^{b}
450	11.59 ^{d}	36.38 ^{a}	17.97 ^{a}	2.38 ^{a}	0.38 ^{a}	0.28 ^{a}

در هر ستون و برای هر صفت، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

In each column and for each attribute, the means that have at least one letter in common are not significantly different based on LSD test at the 5% of probability level.

در پژوهشی بر روی گیاه بابونه مشخص شد که در تنش حضور یون سرب در محیط گیاه، فنول افزایش یافته که خود منجر به افزایش فنیل آلانین آمونیوم لیاز (*PAL*) در گیاه شده است. از طرف دیگر، افزایش کادمیوم در ریشه گیاه بابونه *Matricaria chamomilla*، منجر به تولید پلی فنول اکسیداز شده که فنول را تجزیه کرده و سبب و کاهش محتوی فنول در بابونه شد (Kovacik *et al.*, 2009). بنابراین، به نظر می‌رسد گیاهان دارویی مختلف در استفاده از این آنتی‌اکسیدانت و متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان سیستم دفاعی، یکسان عمل نمی‌کنند.

آنتوسیانین

محتوای آنتوسیانین نیز تحت تأثیر اثر ساده کادمیوم و سرب در سطح ۱ درصد قرار گرفت. این در حالی است که اثر متقابل دو عنصر کادمیوم و سرب بر میزان آنتوسیانین گیاه مرزنجوش معنی‌دار گزارش نشده است (جدول ۱).

میزان آنتوسیانین متناظر با افزودن کادمیوم به محیط، در غلظت ۶، ۱۲و ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک به‌ترتیب ۸۲ درصد، ۱۵۲ درصد و ۲۰۸ درصد افزایش نسبت به شاهد نشان داده است. همچنین در افزودن سرب به محیط، با افزایش غلظت به‌۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، آنتوسیانین به‌ترتیب ۱۶ درصد، ۲۹ درصد و ۵۸ درصد افزایش نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۴).

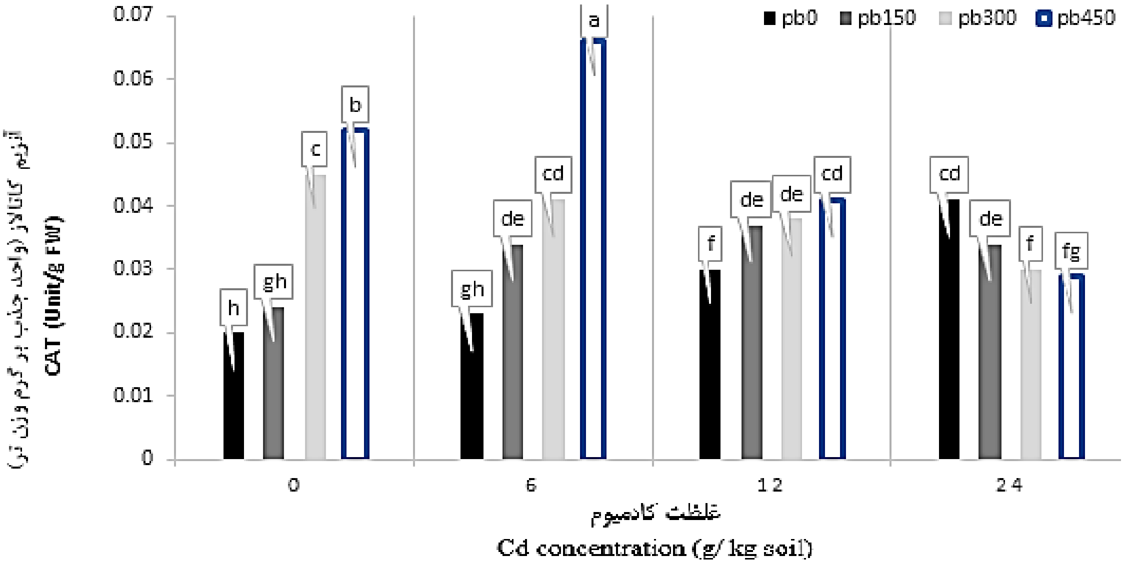
آنتوسیانین‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت و رنگیزه‌های گیاهی، در واکوئل ذخیره می‌شوند تا در زمان وقوع تنش اکسیداتیو وارد عمل شوند (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). برخی پژوهشگران اثرات آنتی‌اکسیدانتی آنتوسیانین را مانند ویتامین E و C می‌پندارند (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). به عبارتی، نوع تأثیر یون فلزی بر میزان رنگیزه‌های گیاهی، به نوع یون فلزی و غلظت آن، نوع گیاه و مدت زمان تنش بستگی دارد (John *et al.*, 2009).

در پژوهشی که بر روی گیاه اسفناج تحت تیمار اثر متقابل کادمیوم و سرب انجام شد، افزایش محتوای آنتوسیانین گزارش شده است (Ghorbani *et al.*, 2016,). درحالی‌که علیپور و همکاران (Alipour *et al.*, 2009) به کاهش آنتوسیانین در حضور کادمیوم و روی اشاره کردند.

آنزیم‌ها

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس، آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف اثر ساده کادمیوم و سرب، در سطح ۱ درصد، تغییرات معنی‌داری را نشان داده است.

همچنین، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر اثر متقابل دو عنصر در سطح ۱ درصد قرار گرفت، درحالی‌که از اثر متقابل دو عنصر تأثیری بر آنزیم گایاکول پراکسیداز گزارش نشد (جدول ۳).



شکل ۱- اثر متقابل کادمیوم × سرب بر فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه مرزنجوش

Figure 1- The interaction effect of cadmium × lead on the catalase enzyme activity of marjoram plant (LSD, *p≤0.05*).

کاتالاز CAT و آسکوربات پراکسیداز APX و گایاکول پراکسیداز GPX

همان‌طور که در شکل ۱ ترسیم شده است، فعالیت آنزیم کاتالاز تا ترکیب غلظت ۶ کادمیوم و ۴۵۰ سرب روند افزایشی داشته است، به گونه‌ای که بیشترین مقدار ثبت شده در همین تیمار بوده است. این روند افزایشی فعالیت کاتالاز در گروه کادمیوم ۲۴ به روند کاهشی تبدیل شده، به‌طوری‌که با افزایش غلظت سرب تا۴۵۰ میلی‌گرم در محیط حاوی کادمیوم ۲۴ میلی‌گرم، کمترین فعالیت این آنزیم مشاهده شد. به عبارتی، به نظر می‌رسد که در افزایش غلظت عناصر سنگین با آسیبی که بر سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاه وارد می‌شود، کاهش فعالیت آنزیمی را سبب می‌شود.

کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های بالا احتمالاً به‌دلیل غیرفعال شدن آنزیم توسط ROS و کاهش سنتز آنزیم و یا تغییر در اجتماع زیرواحدهای آنزیم می‌باشد. از طرفی، ممکن است فعال شدن پروتئازهای پراکسیزومی دلیل دیگری برای کاهش فعالیت آنزیمی باشد. همچنین کاتالاز آنزیمی است که حاوی آهن است. سرب و کادمیوم سبب کاهش جذب آهن هم می‌شود و ازاین‌رو فعالیت کاتالاز در غلظت بالا کاهش می‌یابد (Mishra *et al*., 2006).

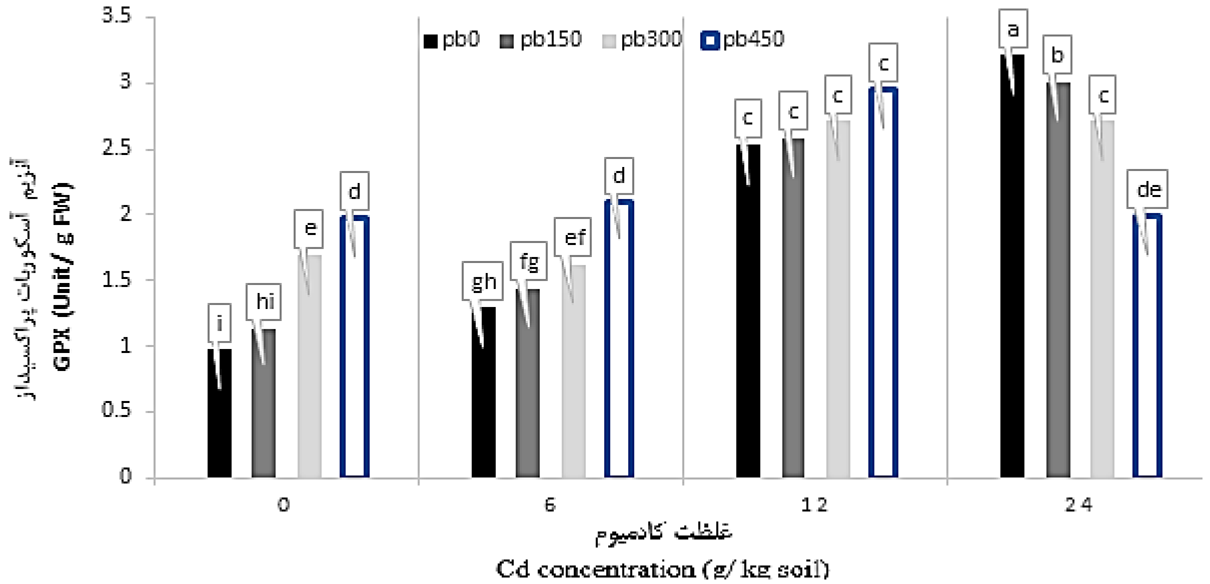
در مطالعه حاضر، با افزایش غلظت کادمیوم و سرب، فعالیت آنزیم GPX افزایش نشان داد. با افزودن ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم به محیط رشد گیاه فعالیت آنزیم GPX نسبت به شاهد ۲۰۴ درصد افزایش نشان داد. افزایش سرب از صفر تا ۴۵۰ سبب افزایش فعالیت آنزیم مذکور به ۴۰ درصد شده است (جدول ۴).

کاتالاز ممکن است در فرآیندهای سیگنالینگ سلولی از طریق کنترل هیدروژن پراکسید نقش داشته باشد و وقتی که فعالیت کاتالاز کاهش یابد، فعالیت آنزیم‌های دیگر حذف‌کننده ROS از طریق یک مسیر جبرانی افزایش می‌یابد. در این شرایط که میزان تولید هیدروژن پراکسید افزایش می‌یابد، گایاکول پراکسیداز نقش بسیار مهم‌تری از کاتالاز درحذف هیدروژن پراکسید دارد. ازاین‌رو، فعالیت گایاکول پراکسیداز نسبت به کاتالاز در غلظت بالای کادمیوم و سرب افزایش می‌یابد (Malecka *et al*., 2012).

مرزنجوش به‌عنوان یک گیاه دارویی با تولید ترکیبات فنلی هم در شرایط عادی و هم در شرایط تنش (جدول ۴) می‌تواند به تولید بیشتر گایاکول پراکسیداز کمک کرده و از این آنزیم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در جهت کاهش اثرات منفی کادمیوم و سرب استفاده نماید. بااین‌حال، در مطالعه حاضر کادمیوم در ایجاد فعالیت این آنزیم بیش از سرب تأثیر داشته که این مسئله با سایر نتایج هماهنگ است. به عبارتی، سمیت بیشتر کادمیوم نسبت به سرب گیاه را در ایجاد پاسخ های دفاعی نیز مجهزتر می‌کند. هر چند باوجود فعال شدن بیشتر سیستم‌های دفاعی، گیاه همچنان از کادمیوم بیش از سرب آسیب دیده است (جدول ۲).

اثر متقابل کادمیوم و سرب بر میزان فعالیت آنزیم APX نشان داد که با افزایش غلظت عناصر، فعالیت آنزیم APX زیاد می‌شود. به‌طوری که بیشترین مقدار ثبت شده در تیمار ۲۴ کادمیوم و صفر سرب است؛ امّا بعد از این تیمار و با افزایش میزان سرب، فعالیت انزیم مذکور روند کاهشی را نشان داد. این کاهش به ۳۸ درصد در تیمار ۲۴ کادمیوم و ۴۵۰ سرب رسید (شکل ۲). به دیدگاه دزی و همکاران (Dezi *et al.*, 2009) می‌توان از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی به‌عنوان یک نشانگر زیستی در محیط استفاده کرد که میزان آلودگی عناصر سنگین را بیان کند.

بااین‌حال میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و GPX وابسته به شدت، مدت و نوع تنش و نوع گیاهان تحت تنش است (Sharma *et al.*, 2012). به‌عنوان مثال، گزارش شده است که در گیاه تاجریزی *Solanum nigrum* با افزایش کادمیوم (۱۵ میکرومولار) در مرحله‌ی جوانه‌زنی فعالیت APX زیاد شده، ولی CAT کاهش می‌یابد (Fidalgo *et al.*, 2011). درحالی‌که در پژوهشی که بر روی غدی سیب‌زمینی انجام شد، متوجه شدند که در القای تنش عناصر سنگین، باافزایش کادمیوم، APX کاهش یافته، ولی فعالیت CAT افزایش می یابد (Stroinski & Kozlowska, 1997).



شکل ۲- اثر متقابل کادمیوم × سرب بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گیاه مرزنجوش

Figure 2- The interaction effect of cadmium ×lead on ascorbate peroxidase enzyme of marjoram plant (LSD, *p≤0.05*)

نتیجه‌گیری

بررسی‌های انجام شده در مطالعه حاضر نشان داد که وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه در حضور کادمیوم و سرب کاهش پیدا می‌کند، در کادمیوم با اثر منفی بیشتر نسبت به سرب، که بر قسمت فتوسنتز، رنگیزه‌ها، زنجیره انتقال الکترون و تولید انرژی گیاه می‌گذارد کاهش وزن بیشتری مشاهده شده است. همچنین این کاهش در اثر متقابل حداکثر غلظت‌های سرب و کادمیوم (۲۴-۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، بیشترین بود. با افزایش غلظت کادمیوم و سرب در محیط کشت غلظت هر دو عنصر در گیاه مورد مطالعه افزایش یافت. همچنین سرب تحرک بسیار کمتری نسبت به کادمیوم و تمایل بیشتری به حضور در ریشه داشته است.

حضور کادمیوم در محیط حاوی سرب، اثر بازدارندگی در جذب سرب توسط گیاه داشته و بالعکس، به گونه‌ای که بازدارندگی سرب از جذب کادمیوم در اندام هوایی به‌طور متوسط ۳۹ درصد و بازدارندگی کادمیوم از جذب سرب به‌طور متوسط ۳۵ درصد است.

افزایش متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی در این مطالعه به موازات افزایش کادمیوم و سرب، حکایت از نقش آن‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در کمک به گیاه در مقابل تنش‌های مذکور دارد. همچنین می‌توانند به همراه افزایش پرولین در تنظیم اسمزی گیاه نقش ایفا کنند.

به نظر می‌رسد که می‌توان از این گیاه در شرایط آلوده به سطوح متوسط و پایین کادمیوم و سرب در فضای سبز معادن استفاده کرد.

References

1- Abdel-Salam, A.A., Salem, H.M., & Seleiman, M.F. (2015). *Phytochemical Removal of Heavy Metal-Contaminated Soils. Heavy Metal Contamination of Soils*,Chapter 16, pp. 299-309. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14526-6_16

2- Aebi, M., Furter, R., & Prand, F. (1984). Structure and function of the TRP3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of transcription, promoter sequence, and sequence coding for a glutamine amidotransferase. *Current Genetics*, *8*, 165-172. https://doi.org/10.1007/BF00417812
3- Alipour Darvari, H., Zare Mayvan, H., & Sharifi, M. (2009). Peroxidase activity in *Raphanus sativus* and its
4- relationship to the amount of heavy metals in soil. *Journal of Science*, *1*, 35-37.
5- Azizi, M., Tafreshi, G., Mirmistafaei, S. (2015). *Breeding of medicinal plants*. Publication, Nakhost. pp. 401. (In Persian)
6- Behtash, F., Tabatabaie, S.J., Malakoti, M.H., & Ostan, S. (2015). The effect of Co and Cd on growth, chlorophyll content, photosynthesis, and cadmium concentration in sugar beet. *Iranian Journal of Soil Research*, *24*(1), 32-41.
7- Bermejo, B.A. (1999). Study of illicit cocaine seizure classification by pattern recognition techniques applied to matal data. *Journal of Forensic Science*, *44*(2), 270-274.
8- Chen, S., Wang, Q., Lu, H., Li, J., Yang, D., Liu, J., & Yan, C. (2019). Phenolic metabolism and related heavy metal tolerance mechanism in *Kandelia Obovat* under Cd and Zn stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *169*, 134-143. https://doi.org/:10.1016/j.econv.2018.11.004
9- Castañeda-Ovando, A., Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., & Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113*, 859–871.
10- Dezi, F., Carbonari, S., & Leoni, G. (2009). A model for the 3D kinematic interaction analysis of pile groups in layered soils. *Earthquake Engineering & Structural Dynamics*, *38*(11),1281-1305
11- Dotaniya, M.L., Rajendiran, S., Coumar, V., Meena, V.D., Saha, J.K., Kundu, S., Kumar, A., & Patra, A.K. (2017). Interactive effect of cadmium and zinc on chromium uptake in spinach grown in Vertisol of Central India. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *15*(1), 341-352. https://doi.org/:10.1007/s13762-017-1396-x
12- Fidalgo, F., Freitas, R., Ferreira, R., Pessoa, A.M., & Teixeira, J. (2011). *Solanum nigrum L.* antioxidant defense system isozymes are regulated transcriptionally and post-translationally in Cd-induced stress. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 312-319. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.04.007
13- Gao, J.Z., Gray, D.B., Motheram, R., & Hussain, M.A. (2000). Importance of inlet air velocity in fluid bed drying of a granulation prepared in a high shear granulator. *The AAPS Journal*, 1
14- Ghada, M. (2017). Efficacy of some Sudanese medicinal plants extracts to remove heavy metals from water. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *11*(3), 51-55.
15- Glick, B.R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, *28*(3), 367-374. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001
16- Gonzaga, M.I.S., Santos, J.A.G., & Ma, L.Q. (2006). Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. *Scientia Agricola*, *63*, 90-101. https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000100015
17- Ghorbani, H., Heydari, M., & Ghafari, M. (2016). The effect of different levels of salinity and heavy metals lead and cadmium on the growth of photosynthetic pigments and the amounts of sodium and potassium in spinach. *Soil andPlant Interaction*, *7*(24), 15-23. (In Persian)
18- Heath, R.L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *125*, 189–198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1
19- Hernandez, I., Alegre, L., Breusegem, F.V., & Munne-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, *14*, 125–132. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.12.003
20- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., & Sharma, S. (2009). Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*, *3*(3), 65-76.
21- Kaur, J., Yadav, S., & Singh, Z. (2012). Orbital dimensions - A direct measurement study using dry skulls. *Journal of Academic and Industrial Research*, *1*(6), 293-295.
22- Keilig, K., & Ludwig-Müller, J. (2009). Effect of flavonoids on heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Botanical Studies*, *50*(3), 311.
23- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Štork, F., & Bačkor, M. (2009). Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant and Soil*, 320-231. https://doi.org/10.1007/s11104-009-9889-0
24- Liu, X., Yang, C., Zhang, L., Li, L., Liu, S., Yu, J., You, L., Zhou, D., Xia, C., Zhao, J., & Wu, H. (2011). Metabolic profiling of cadmium-induced effects in one pioneer intertidal halophyte *Suaeda salsa* by NMR-based metabolomics. *Ecotoxicology*, *20*, 1422-1431. https://doi.org/10.1007/s10646-011-0699-9
25- Malecka, A., Piechalak, A., Mensinger, A., Hanc, D., Baralkiewicz, D., & Tomaszewska, B. (2012). Antioxidative defense system in *Pisum sativum* roots exposed to heavy metals (Pb, Cu, Cd, and Zn). *Polish Journal of Environmental Studies*, *21*(6), 1721-1730.

26- Márquez-García, B., Fernández, M.Á., & Córdoba, F. (2009). Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *Bioresource Technology*, *100*(1), 446-451. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.070
27- McGrath, S.P., Chaudri, A.M., & Giller, K.E. (1995). Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms, and plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *14*(2), 94-104. https://doi.org/10.1007/BF01569890
28- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., & Gupta, D.K. (2006). Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum L.*) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, *65*, 1027-1039. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.033
29- Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiology*, *180*(3), 1246–1250. https://doi.org/10.1104/pp.19.00405
30- Naderi, N., Mirzamasoumzadeh, B., & Aghaei, A. (2013). Effects of different levels of Lead (Pb) on physiological characteristics of sugar beet. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, *5*(10), 1154-1157.
31- Nieboer, E., & Richardson, D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*, *1*, 3-26. https://doi.org/10.1016/0143-148X(80)90017-8
32- Pandey, R.K., Herrera, W.A.T., Pendleton, J.W., & Villegas. A.N. (1984). Drought response of grain legumes under irrigation gradient. *Agronomy Journal*, *76*, 557-560.
33- Peter, E., & Gbadegesin, A. (2011). Spatial relationships of urban land use, soils and heavy metal concentrations in Lagos Mainland area. *Journal of Applied Science and Environmental Management*, *15*(2), 391–399. https://doi.org/10.4314/jasem.v15i2.68533
34- Pourghasemian, N., Landberg, T., Ehsanzadeh, P., & Gregerb, M. (2019). Different response to Cd stress in domesticated and wild safflower (*Carthamus* spp.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *171*, 321–328. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.052
35- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., & Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *213*, 113-136.
36- Rashid, A., Schutte, J., Ulery, A., Deyholos, M.K., Sanogo, S., Lehnhoff, E., & Beck, L. (2023) .Heavy metal contamination in agricultural soil: Environmental pollutants affecting crop health. *Agronomy* https://doi.org/10.3390/13061521
37- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, *177*(1), 67-80. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00196-8
38- Seung, A.B, Taejun, H, Soon-Kil, A., Hara, K, Myung, R., Suk-Chan, L., & Kyung-Hoan, I. (2012). Effects of heavy metals on plant growths and pigment contents in *Arabidopsis thaliana .Plant Pathology of Journal*, *28*(4), 446-452.
39- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defence mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 217037. https://doi.org/10.1155/2012/217037
40- Siddique, M.N.I., & Wahid, Z.A. (2018). Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. *Journal of Cleaner Production*, *194*, 359-371. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.155
41- Stroinski A, & Kozlowska M. (1997). Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 66, 189–195.
42- Taamalli, M., D'Alessandro, A., Marrocco, C., Gevi, F., Timperio, A.M., & Zolla, L. (2015). Proteomic and metabolic profiles of *Cakile maritima* Scop. Sea rocket grown in the presence of cadmium. *Molocloar BioSystem*, *11*, 1096-1109.
43- Wanger, G.J. (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, *64*, 88-93.
44- Zhao, F.J., & Wang, P. (2020). Arsenic and cadmium accumulation in rice and mitigation strategies. *Plant Soil*, *446*, 1–21. https://doi.org/10.1007/s11104-019-04374-6